

STN Karlsruhe

L8 ANSWER 1 OF 1 WPIDS COPYRIGHT 2006 THE THOMSON CORP on STN  
AB WO2004053131 A UPAB: 20040712

NOVELTY - Preparing enantiomerically enriched R- alpha -lipoic acid (I) comprising growing a cell (A) that has reduced activity of lipoyl-protein ligase A (LplA) activity, so that (I) is secreted in free form into the culture medium, from which it is recovered, is new.

DETAILED DESCRIPTION - An INDEPENDENT CLAIM is also included for a cell with reduced activity of lipoyl-protein ligase A (LplA) activity and able to secrete (I) into the culture medium.

ACTIVITY - Antidiabetic; Neuroprotective; Ophthalmological; Cardiant. No biological data given.

MECHANISM OF ACTION - Antioxidant; also the dihydro form of (I) regenerates oxidized forms of other antioxidants, particularly ascorbic acid and tocopherol.

USE - (I) is an essential cofactor for many multienzyme complexes and is used as a pharmaceutical (for prevention or treatment of type II diabetes and its sequelae, e.g. polyneuropathy, cataract and cardiovascular disease) and as a food supplement.

ADVANTAGE - The method produces the R form only, avoiding the side effects associated with the S form. Eliminating activity of LplA ensures that (I) is secreted; normally it is linked to the E2 subunit of an alpha -ketoacid dehydrogenase from which it has to be released in a separate hydrolysis reaction. (I) is easily isolated from culture media, without requiring cell lysis.

Dwg.0/2

**This Page Blank (uspto)**



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 102 58 127 A1** 2004.07.08

(12)

## Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **102 58 127.4**  
(22) Anmeldetag: **12.12.2002**  
(43) Offenlegungstag: **08.07.2004**

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: **C12P 11/00**  
**C12N 9/00**

(71) Anmelder:  
**Consortium für elektrochemische Industrie  
GmbH, 81379 München, DE**

(74) Vertreter:  
**Franke, E., Dr., 81737 München**

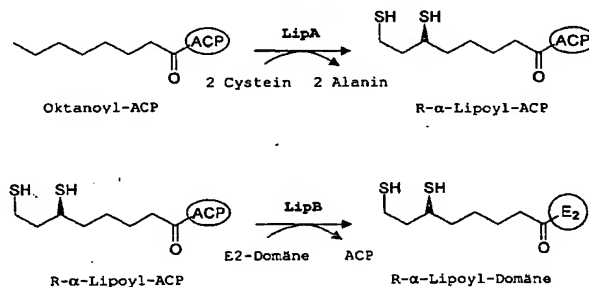
(72) Erfinder:  
**Daßler, Tobias, Dipl.-Biol. Dr., 81825 München, DE**

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur fermentativen Herstellung von R- $\alpha$ -Liponsäure**

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von R- $\alpha$ -Liponsäure mittels Fermentation, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass eine Zelle, die eine abgeschwächte Lipoyl-Protein-Ligase A-Aktivität aufweist, in einem Kulturmedium kultiviert wird, wobei die Zelle enantiomerenreine R- $\alpha$ -Liponsäure in freier Form in das Kulturmedium ausscheidet und die enantiomerenreine R- $\alpha$ -Liponsäure von dem Kulturmedium abgetrennt wird.



## Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur fermentativen Herstellung der R- $\alpha$ -Liponsäure und für das Verfahren besonders geeignete Zellen.

[0002] R- $\alpha$ -Liponsäure ist in einer Vielzahl von Pro- und Eukaryonten ein essentieller Cofaktor bestimmter Multienzymkomplexe. Dabei ist die R- $\alpha$ -Liponsäure jeweils mit seiner Carboxylgruppe unter Bildung eines sogenannten Lipoamids kovalent an die  $\epsilon$ -Aminogruppe eines spezifischen Lysin-Rests des entsprechenden Enzyms gebunden. Auf diese Weise ist die R- $\alpha$ -Liponsäure ein Teil der E2-Untereinheit der Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) [EC 2.3.1.12] bzw. der  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase (KGDH) [EC 2.3.1.61] und spielt dort als Redoxpartner und Acylgruppenüberträger eine entscheidende Rolle bei der oxidativen Decarboxylierung von  $\alpha$ -Ketosäuren. Außerdem fungiert R- $\alpha$ -Liponsäure als Aminomethyl-Carrier in Glycin-Cleavage Enzymsystemen.

[0003]  $\alpha$ -Liponsäure ist ein optisch aktives Molekül mit einem Chiralitätszentrum am Kohlenstoffatom C6. Dabei stellt die R-Konfiguration der  $\alpha$ -Liponsäure das natürlich vorkommende Enantiomer dar. Nur diese Form zeigt physiologische Aktivität als Cofaktor der entsprechenden Enzyme.  $\alpha$ -Liponsäure kann sowohl in einer oxidierten (5-[1,2]-Dithiolan-3-yl-Pentansäure) als auch in einer reduzierten Form (6,8-Dimercapto-Oktansäure) vorkommen. Im Folgenden sind unter der Bezeichnung " $\alpha$ -Liponsäure" beide Formen sowie die jeweiligen Salze der  $\alpha$ -Liponsäure, wie z. B. das Calcium-, Kalium-, Magnesium-, Natrium- oder das Ammoniumsalz zu verstehen.

## Stand der Technik

[0004] Die Biosynthese von R- $\alpha$ -Liponsäure wurde besonders an dem Bakterium *Escherichia coli* intensiv untersucht (s. Fig. 1). Hier dient Oktansäure, die an das Acyl-Carrier-Protein (ACP) kovalent gebunden ist, als spezifische Vorstufe bei der Liponsäure-Synthese. In einer komplexen Reaktion werden zwei Schwefelatome auf die derart aktivierte Oktansäure (Oktanoyl-ACP) übertragen, wobei R- $\alpha$ -Lipoyl-ACP entsteht. Diese Reaktion wird von der Liponsäure-Synthase [EC 2.8.1.-], dem lipA-Genprodukt, katalysiert. Als Schwefeldonor dient dabei letztendlich die Aminosäure L-Cystein. Der anschließende Transfer der R- $\alpha$ -Liponsäure von R- $\alpha$ -Lipoyl-ACP auf die E2-Untereinheit der  $\alpha$ -Ketosäure-Dehydrogenasen wird von der Lipoyl-Protein-Ligase B [EC 6.-.-.-], dem lipB-Genprodukt, katalysiert, ohne dass dabei jedoch R- $\alpha$ -Lipoyl-ACP oder R- $\alpha$ -Liponsäure als freie Zwischenprodukte auftreten (Miller et al., 2000, Biochemistry 39:15166-15178).

[0005] *E. coli* kann aber auch freie R- $\alpha$ -Liponsäure aus dem umgebenden Medium aufnehmen und für die Bildung funktioneller  $\alpha$ -Ketosäure-Dehydrogenasen verwenden. Dazu wird R- $\alpha$ -Liponsäure zunächst mittels ATP zu R- $\alpha$ -Lipoyl-AMP aktiviert und anschließend auf die entsprechenden Enzym-Untereinheiten übertragen (s. Fig. 2). Beide Aktivitäten werden von der Lipoyl-Protein-Ligase A [EC 6.-.-.-], dem lplA-Genprodukt, katalysiert (Morris et al., 1994, J. Biol. Chem. 269: 16091-16100). Diese LplA-Aktivität ist für Wildtypstämme von *E. coli* allerdings nicht essentiell, wenn die endogene Liponsäure-Synthese und der Transfer der Lipoyl-Gruppe über den LipA/LipB-Weg erfolgt. So wurden beispielsweise lplA-Mutanten beschrieben, die keine nachweisbare Lipoyl-Protein-Ligase A-Aktivität mehr besitzen, deren Phänotyp aber unter normalen Wachstumsbedingungen nicht von einer Wildtyp-Zelle zu unterscheiden ist (Morris et al., 1994, J. Biol. Chem. 269: 16091-16100; Morris et al., 1995, J. Bacteriol. 177: 1-10).

[0006] Über die Biosynthese von R- $\alpha$ -Liponsäure in Eukaryonten ist wenig bekannt. Es wird aber vermutet, dass die R- $\alpha$ -Liponsäure-Synthese sowie der Transfer auf die entsprechenden Enzyme in den Mitochondrien eukaryontischer Zellen auf ähnliche Weise wie in Bakterien erfolgt.

[0007] Neben ihrer Relevanz als essentieller Bestandteil von Enzymen mit einer zentralen Rolle im Stoffwechsel, wurde schon früh die Bedeutung der  $\alpha$ -Liponsäure für die Pharmakotherapie sowie für die Nahrungsmittelergänzung (Nutraceutical) erkannt:  $\alpha$ -Liponsäure besitzt aufgrund ihrer beiden Thiolgruppen eine ausgeprägte Wirksamkeit als Antioxidans und kann deshalb den Organismus vor schädlichen Prozessen, die durch oxidativen Stress induziert werden, schützen. Außerdem ist  $\alpha$ -Dihydroliponsäure, die reduzierte Form der  $\alpha$ -Liponsäure, aufgrund ihrer Eigenschaft als starkes Reduktionsmittel in der Lage, andere oxidierte natürliche Antioxidationsmittel im Körper wie Ascorbinsäure oder  $\alpha$ -Tocopherol direkt oder indirekt zu regenerieren oder bei deren Mangel diese auch zu ersetzen. Entsprechend kommt der  $\alpha$ -Liponsäure im Zusammenspiel mit Ascorbinsäure,  $\alpha$ -Tocopherol und Glutathion, dem sogenannten "Netzwerk der Antioxidantien", eine zentrale Bedeutung zu.  $\alpha$ -Liponsäure wird außerdem zur Prävention und Bekämpfung von Diabetes mellitus Typ II und dessen Folgeschäden, wie z. B. Polyneuropathie, Cataract oder Kardiovaskularleiden eingesetzt.

[0008] Die unterschiedliche biologische Aktivität beider Enantiomere der  $\alpha$ -Liponsäure ist derzeit Gegenstand intensiver Untersuchungen, wobei sich allerdings immer mehr herauskristallisiert, dass die Applikation des reinen R-Enantiomers der  $\alpha$ -Liponsäure deutliche Vorteile gegenüber der S-Form aufweist. So wurde im *in vitro*-Versuch gezeigt, dass nur die natürliche R- $\alpha$ -Liponsäure zur Bildung funktioneller  $\alpha$ -Ketosäure-Dehydrogenasen führt. Das S-Enantiomer hatte dagegen sogar einen inhibierenden Effekt auf die Stimulierung der En-

zymaktivität durch R- $\alpha$ -Liponsäure. Die Reduktion von  $\alpha$ -Liponsäure und damit die Regeneration der antioxidativ wirksamen  $\alpha$ -Dihydroliponsäure in den Mitochondrien ist für die Zelle von essentieller Bedeutung. Die mitochondriale NADH-abhängige Lipoamid-Reduktase von Säugern zeigt mit dem R-Enantiomer eine fast 20-fach höhere Aktivität als mit der S-Form. Des Weiteren hat R- $\alpha$ -Liponsäure verglichen mit dem S-Enantiomer einen deutlich stärkeren Effekt auf die Insulin-vermittelte Glucose-Aufnahme und den Glucose-Metabolismus von Skelettmuskelzellen insulinresistenter Ratten. Im Tierversuch zeigte die R-Form außerdem einen antiphlogistischen Effekt, während die S-Form eher eine analgetische Wirkung hatte. Um unerwünschte Nebeneffekte zu vermeiden, ist es daher äußerst wünschenswert,  $\alpha$ -Liponsäure jeweils nur in der enantiomerenreinen Form zu applizieren.

[0009] Derzeit erfolgt die großtechnische Herstellung von  $\alpha$ -Liponsäure ausschließlich mittels chemischer Verfahren, wobei immer das Razemat aus R- und S-Form als Endprodukt gebildet wird (Yadav et al., 1990, J. Sci. Ind. Res. 49: 400-409). Zur Gewinnung von enantiomerenreiner R- $\alpha$ -Liponsäure wurden verschiedene Verfahren entwickelt. Beispielsweise kann das Razemat der  $\alpha$ -Liponsäure oder eines der Syntheseintermediate entweder chemisch mittels chiraler Hilfssubstanzen (Walton et al., 1954, J. Amer. Chem. Soc. 76: 4748; DE 4137773) oder enzymatisch (Adger et al., 1995, J. Chem. Soc., Chem. Commun.: 1563-1564) aufgespalten werden. In anderen Verfahren unterbleibt die Entstehung eines Razemats aufgrund eines enantioselektiven Syntheseschritts, wobei das neue Chiralitätszentrum entweder chemisch (DE 3629116; DE 19533881; Bringmann et al., 1999, Z. Naturforsch. 54b: 655-661; DE 10036516) oder durch eine stereospezifische Biotransformation mittels Mikroorganismen eingeführt werden kann (Gopalan und Jacobs, 1989, Tetrahedron Lett. 30: 5705-5708; Dasaradhi et al., 1990, J. Chem. Soc., Chem. Commun.: 729-730; DE 10056025). Andere Prozesse wiederum starten die chemische Synthese von enantiomerenreiner  $\alpha$ -Liponsäure mit einem natürlich vorkommenden chiralen Edukt wie z. B. S-Maleinsäure oder D-Mannitol (Brookes und Golding, 1988, J. Chem. Soc. Perkin Trans. I: 9-12; Rama Rao et al., 1987, Tetrahedron Lett. 28, 2183-2186). Wegen z. T. aufwendiger Syntheseschritte, geringer Ausbeuten und hoher Materialkosten sind alle bekannten Methoden zur Herstellung von enantiomerenreiner R- $\alpha$ -Liponsäure derzeit nicht wirtschaftlich.

[0010] Die großtechnische Herstellung vieler niedermolekularer Naturstoffe, wie z.B. Antibiotika, Vitamine oder Aminosäuren erfolgt heute oftmals mittels eines fermentativen Verfahrens unter Verwendung verschiedener Stämme von Mikroorganismen.

[0011] Die Anmeldungen am Deutschen Patent- und Markenamt mit den Aktenzeichen 10235270.4 und 10245993.2 beschreiben ein Verfahren, bei dem die Produktion von enantiomerenreiner R- $\alpha$ -Liponsäure ausschließlich in einem Fermentationsprozeß erfolgt. Dabei werden Zellen eingesetzt, die ein Liponsäure-Synthase-Gen bzw. ein Lipoyl-Protein-Ligase B-Gen einzeln oder auch in Kombination überexprimieren. Die Produktion von enantiomerenreiner R- $\alpha$ -Liponsäure erfolgt allerdings in noch sehr beschränktem Ausmaß, so dass diese fermentativen Verfahren derzeit noch nicht mit der chemischen Synthese konkurrieren können.

[0012] Nur in seltenen Fällen führt jedoch eine einzige genetische Manipulation im Zuge des sogenannten "metabolic engineering" eines Wildtypstammes zur Überproduktion der gewünschten Verbindung in ausreichendem Umfang. Vielmehr ist dazu eine Kombination von gezielten genetischen Manipulationen notwendig, oftmals noch ergänzt durch klassische Mutagenese/Screening-Ansätze.

#### Aufgabenstellung

[0013] Entsprechend ist es die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein leistungsfähigeres Verfahren zur fermentativen Herstellung von enantiomerenreiner R- $\alpha$ -Liponsäure bereitzustellen.

[0014] Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass eine Zelle, die eine abgeschwächte Lipoyl-Protein-Ligase A-Aktivität aufweist, in einem Kulturmedium kultiviert wird, wobei die Zelle enantiomerenreine R- $\alpha$ -Liponsäure in freier Form in das Kulturmedium ausscheidet und die enantiomerenreine R- $\alpha$ -Liponsäure vom Kulturmedium abgetrennt wird.

[0015] Unter einer abgeschwächten Lipoyl-Protein-Ligase A-Aktivität ist im Sinne der vorliegenden Erfindung vorzugsweise zu verstehen, dass die intrazelluläre Aktivität des LplA-Proteins in der Zelle im Vergleich zu einer Wildtyp-Zelle um 25 bis 100 %, besonders bevorzugt um 75 bis 100 % verringert ist. Ganz besonders bevorzugt ist die intrazelluläre Aktivität des LplA-Proteins völlig ausgeschaltet.

[0016] Aus physiologischen und biochemischen Daten geht hervor, dass Liponsäure in Wildtyp-Zellen nahezu ausschließlich in gebundener Form vorkommt, da bereits die Synthese der R- $\alpha$ -Liponsäure vollständig proteingebunden erfolgt (vgl. Fig. 1) (Herbert und Guest, 1975, Arch. Microbiol. 106: 259-266; Miller et al., 2000, Biochemistry 39:15166-15178). Die Lipoyl-Protein-Ligase A ist nicht an der de novo-Synthese von R- $\alpha$ -Liponsäure beteiligt, vielmehr besteht die Aktivität dieses Enzyms in der Kopplung von freier R- $\alpha$ -Liponsäure an die E2-Untereinheiten von  $\alpha$ -Ketosaure-Dehydrogenasen. Überraschenderweise wurde nun gefunden, dass eine Verringerung oder die vollständige Ausschaltung der Lipoyl-Protein-Ligase A-Aktivität in einem Wildtyp-Stamm zur Anhäufung freier, enantiomerenreiner R- $\alpha$ -Liponsäure im Kulturmedium dieser Zellen führt, obwohl sowohl in einem E. coli Wildtyp-Stamm als auch in einer lplA-Mutante alle Lipoyl-Bindestellen der E2-Untereinheiten

mit R- $\alpha$ -Liponsäure abgesättigt sind (Packuran et al., 1991, Biochem. J. 277: 153-158; Morris et al., 1995, J. Bacteriol. 177: 1-10) und somit das Substrat des LplA-Proteins (eine unbeladene E2-Untereinheit) fehlt. Darüber hinaus ist die Expression des lplA-Gens in einem E. coli Wildtyp-Stamm ohnehin nur äußerst schwach. Entsprechend kommen nur wenige Moleküle ( $< 10$ ) der Lipoyl-Protein-Ligase A in einer Zelle vor (Green et al., 1995, Biochem. J. 309: 853-862). Es ist daher umso erstaunlicher, dass nun eine Verringerung oder vollständige Ausschaltung der Lipoyl-Protein-Ligase A-Aktivität die Exkretion von R- $\alpha$ -Liponsäure zur Folge hat.

[0017] Die Ausscheidung freier R- $\alpha$ -Liponsäure aus den Zellen erlaubt eine einfache Isolierung des Produkts aus dem Kulturmedium nach Abtrennung der Biomasse, ohne dass die Zellen zuvor aufgebrochen werden müssen, bzw. ohne dass die R- $\alpha$ -Liponsäure durch einen aufwendigen und verlustreichen Hydrolyseschritt vom daran gebundenen Trägerprotein (ACP oder die E2-Untereinheit der  $\alpha$ -Ketosäure-Dehydrogenasen) abgespalten werden muss.

[0018] Unter der vom lplA-Gen codierten Lipoyl-Protein-Ligase A-Aktivität ist diejenige Lipoyl-Protein-Ligase-Aktivität einer Zelle zu verstehen, welche eine deutliche Substratpräferenz für freie R- $\alpha$ -Liponsäure im Vergleich zu R- $\alpha$ -Lipoyl-ACP aufweist. Das LplA-Protein hat mit freier R- $\alpha$ -Liponsäure etwa eine 100-fach höhere Aktivität, als mit R- $\alpha$ -Lipoyl-ACP. Damit unterscheidet sich die Lipoyl-Protein-Ligase A-Aktivität einer Zelle eindeutig von der Lipoyl-Protein-Ligase B-Aktivität, welche R- $\alpha$ -Lipoyl-ACP gegenüber freier R- $\alpha$ -Liponsäure als Substrat bevorzugt (s. Fig. 1 und 2).

[0019] Vorzugsweise handelt es sich bei dem Lipoyl-Protein-Ligase A-Gen um ein Gen mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 oder um eine funktionelle Variante dieses Gens.

[0020] Unter einer funktionellen Variante ist im Sinne der vorliegenden Erfindung eine DNA-Sequenz zu verstehen, die sich durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz ableitet, wobei die enzymatische Aktivität und Spezifität der durch das Gen codierten Lipoyl-Protein-Ligase A erhalten bleibt.

[0021] Das Lipoyl-Protein-Ligase A-Gen codiert für ein Protein umfassend die Sequenz ID NO: 2 oder funktionelle Varianten mit einer Sequenzhomologie zu SEQ ID NO: 2 größer 35 %.

[0022] Vorzugsweise ist die Sequenzhomologie zu SEQ ID NO: 2 größer 60 %, besonders bevorzugt ist die Sequenzhomologie zu SEQ ID NO: 2 größer 80 %.

[0023] In der vorliegenden Erfindung beziehen sich alle erwähnten Homologiewerte auf Ergebnisse, die mit dem Algorithmus GAP (GCG Wisconsin Package, Genetics Computer Group (GLG) Madison, Wisconsin) erhalten werden.

[0024] Dem Fachmann sind zur Abschwächung einer Enzymaktivität in einer Zelle eine Reihe von Möglichkeiten bekannt. Eine Abschwächung kann beispielsweise durch Verminderung der Expression des entsprechenden Gens erzielt werden oder durch Austausch des chromosomalen Wildtyp-Gens gegen ein mutiertes Allel, das für ein Enzym mit einer verminderten Aktivität codiert. Im Extremfall kann die Enzymaktivität auch völlig ausgeschaltet werden.

[0025] Die Expression eines Gens kann zum Beispiel durch folgende Maßnahmen verringert oder verhindert werden:

- Abschwächung des Promotors durch geeignete Basensubstitutionen
- Inaktivierung/Veränderung eines für die Expression nötigen Transkriptionsaktivators
- Abschwächung von Translationsstartsignalen (z. B. Ribosomenbindestelle, Startcodon) durch geeignete Basensubstitutionen
- Entfernung von mRNA-stabilisierenden Regionen des Gens
- Überexpression von für spezifische Antisense-RNA codierenden DNA-Bereichen
- Deletion des gesamten Gens oder zumindest eines wichtigen Teils davon
- Zerstörung des Gens durch Insertion von beispielsweise einer Antibiotikumsresistenzkassette

[0026] Mutierte Allele eines Gens, die für ein Enzym mit einer verminderten Aktivität codieren, können beispielsweise durch folgende Maßnahmen erzeugt werden:

- Einführung von Leserasterverschiebungen in das entsprechende Gen aufgrund von Nukleotid-Deletionen oder -Insertionen
- Einführung spezifischer Basensubstitutionen im Gen, welche den Austausch von konservierten oder von für die Aktivität essentiellen Aminosäuren zur Folge haben

[0027] Mutierte Allele des lplA-Gens können mit Standardmethoden der Molekularbiologie erzeugt werden. Eine bevorzugte Möglichkeit dafür besteht in der Einführung spezifischer Basensubstitutionen in das Gen. Dies kann beispielsweise dadurch erfolgen, dass während der Amplifikation des lplA-Gens mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durch Verwendung von speziellen mutagenen Primern die Basensequenz des Gens oder seines Promotors an einer oder mehreren Positionen spezifisch verändert werden (ortspezifische Mutagenese).

[0028] Besonders bevorzugt ist die Einführung einer Deletion in das lplA-Gen. Dies kann dadurch erreicht

werden, dass das Gen nach der Amplifikation mittels PCR unter Einsatz von spezifischen Primern, die das komplette *lplA*-Gen erfassen, zunächst in einen Plasmid-Vektor (z.B. pUC18, pBR322, pACYC184) kloniert wird. Durch Restriktion des so erhaltenen Plasmids mit geeigneten Restriktionsendonukleasen, die nur im Bereich des *lplA*-Gens schneiden, können interne Regionen des Gens entfernt werden. Auf diese Weise kann nach Religation des restringierten Plasmids eine interne Deletion in das *lplA*-Gen eingeführt werden. Alternativ zur Religation des im *lplA*-Gen restringierten Plasmids kann auch eine Antibiotikumsresistenzkassette in das *lplA*-Gen kloniert werden.

[0029] Methoden zum Austausch einer beliebigen chromosomalen DNA-Sequenz gegen eine zwar homologe, aber durch Baseninsertionen, -deletionen oder -substitutionen veränderte Sequenz sind dem Fachmann bekannt. So kann in *Escherichia coli* beispielsweise das von Link et al. (1997, J. Bacteriol. 179: 6228-6237) beschriebene System verwendet werden, um mittels integrativer Plasmide über den Mechanismus der homologen Rekombination die chromosomale Wildtyp-Sequenz des *lplA*-Gens gegen ein mutiertes *lplA*-Allel auszutauschen.

[0030] In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden Zellen eingesetzt, die enantiomerenreine R- $\alpha$ -Liponsäure in ein Kulturmedium sekretieren und eine abgeschwächte Lipoyl-Protein-Ligase A-Aktivität aufweisen, wobei sie anstelle eines Wildtyp *lplA*-Gens ein *lplA*-Allel besitzen, das eine Basensubstitution im Bereich der Basenpaare 367-465 aufweist, welche dazu führt, dass das LplA-Protein eine um mindestens 50 % verminderte Aktivität hat oder eine Deletion im *lplA*-Gen aufweisen.

[0031] Die vorliegende Erfindung betrifft somit auch eine Zelle mit vorgenannten Eigenschaften.

[0032] Vorzugsweise ist die Aktivität des LplA-Proteins um 50 bis 100, besonders bevorzugt um 75% bis 100 vermindert.

[0033] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Zellen führt eine Basensubstitution in dem genannten Genbereich dazu, dass keine Aktivität des LplA-Proteins mehr nachweisbar ist.

[0034] In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Zellen befindet sich auf dem Chromosom des Wirtsorganismus nur noch ein durch eine interne Deletion erzeugtes Fragment des *lplA*-Gens, welches nicht mehr für eine funktionelle Lipoyl-Protein-Ligase A-Aktivität codieren kann.

[0035] Zellen mit abgeschwächter Lipoyl-Protein-Ligase A-Aktivität lassen sich dadurch herstellen, dass in eine Ausgangszelle anstelle des *lplA*-Wildtyp-Gens ein *lplA*-Allel codierend für ein Lp1A-Protein mit einer um mindestens 50 % im Vergleich zum Wildtyp-Protein verminderten Aktivität eingebracht wird.

[0036] In einer Vielzahl von pro- und eukaryontischen Zellen bzw. Organismen konnten Gene, die für eine Lipoyl-Protein-Ligase A codieren sowie Gene, die für die de novo-Synthese von R- $\alpha$ -Liponsäure benötigt werden (z.B. *lipA*, *lipB*), identifiziert werden. Erfindungsgemäße Zellen lassen sich somit vorzugsweise aus Zellen von pro- oder eukaryontischen Organismen herstellen, die in der Lage sind, R- $\alpha$ -Liponsäure selbst zu synthetisieren (Ausgangszelle), die rekombinanten Verfahren zugänglich sind und die durch Fermentation kultivierbar sind. Auch pflanzliche oder tierische Zellen, die in Zellkultur züchtbar sind, sind somit zur Herstellung erfindungsgemäßer Zellen geeignet.

[0037] Zur Herstellung erfindungsgemäßer Zellen können Ausgangszellen verwendet werden, die bisher noch keinerlei Manipulation unterzogen wurden.

[0038] Des weiteren ist es jedoch möglich, die erfindungsgemäßen Zellen auch mit Maßnahmen zu kombinieren, die bereits zu einer verbesserten Produktion von R- $\alpha$ -Liponsäure führen. So sind beispielsweise solche Zellen besonders geeignet, die durch eine im Vergleich zum Wildtyp verstärkte Expression des *lipA*-Gens bereits eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Liponsäure-Synthase-Aktivität aufweisen und/oder durch eine im Vergleich zum Wildtyp verstärkte Expression des *lipB*-Gens bereits über eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Lipoyl-Protein-Ligase B-Aktivität verfügen. Die Herstellung von Zellen mit einer im Vergleich zum Wildtyp verstärkten Liponsäure-Synthase-Aktivität und/oder einer im Vergleich zum Wildtyp verstärkten Lipoyl-Protein-Ligase B-Aktivität sind in den Patentanmeldungen DE 10235270 und DE 10245993 beschrieben.

[0039] Die Erfindung betrifft somit insbesondere auch Zellen, die zusätzlich zur um mindestens 50 % verminderten oder fehlenden Aktivität des LplA-Proteins durch eine verstärkte Expression des *lipA*-Gens, eine erhöhte Liponsäure-Synthase-Aktivität oder durch eine verstärkte Expression des *lipB*-Gens bereits über eine erhöhte Lipoyl-Protein-Ligase B-Aktivität verfügen.

[0040] Bevorzugt handelt es sich bei den Zellen um Mikroorganismen, wie zum Beispiel Hefe- oder Bakterienstämme. Besonders bevorzugt handelt es sich um Bakterienstämme aus der Familie der Enterobacteriaceae, ganz besonders bevorzugt um Stämme der Art *Escherichia coli*.

[0041] Die Gewinnung von R- $\alpha$ -Liponsäure aus dem Kulturmedium kann nach dem Fachmann bekannten Verfahren, wie beispielsweise Zentrifugation des zellhaltigen Kulturmediums zur Abtrennung der Zellen und durch anschließende Extraktion und/oder Präzipitation des Produkts erfolgen.

[0042] Die Kultivierung der erfindungsgemäßen Zellen zur Produktion von R- $\alpha$ -Liponsäure erfolgt vorzugsweise in einem aus der Literatur bekannten Minimalsalzmedium (Herbert und Guest, 1970, Meth. Enzymol. 18A, 269-272).

[0043] Als Kohlenstoffquelle können prinzipiell alle verwertbaren Zucker, Zuckeralkohole oder organische

Säuren bzw. deren Salze verwendet werden. Dabei werden bevorzugt Asparaginsäure, Äpfelsäure, Bernsteinsäure, Brenztraubensäure, Fumarsäure, Glutaminsäure, Glucose, Glycerin oder Oxalessigsäure eingesetzt. Besonders bevorzugt sind Bernsteinsäure und Oxalessigsäure. Auch ist eine kombinierte Fütterung mehrerer verschiedener Kohlenstoffquellen möglich. Des weiteren können kurzkettige Fettsäuren mit einer Kettenlänge von C2-C8, bevorzugt mit einer Kettenlänge von C6-C8 (Hexan- bzw. Oktavsäure) als spezifische Vorstufen für die  $\alpha$ -Liponsäure-Synthese dem Medium zugesetzt werden. Dabei beträgt die Konzentration der zugesetzten Kohlenstoffquelle vorzugsweise 0,1-30 g/l.

[0044] Die Inkubation der erfindungsgemäßen Zellen erfolgt vorzugsweise unter aeroben Kultivierungsbedingungen über einen Zeitraum von 16 – 150 h und im Bereich der für die jeweiligen Zellen optimalen Wachstumstemperatur.

[0045] Als optimaler Temperaturbereich werden 15 – 55 °C bevorzugt. Besonders bevorzugt ist eine Temperatur zwischen 30 und 37 °C.

[0046] Der Nachweis und die Quantifizierung der im erfindungsgemäßen Verfahren produzierten R- $\alpha$ -Liponsäure erfolgt beispielsweise mittels eines Bioassays unter Verwendung eines liponsäureauxotrophen Indikatorstammes (lipA-Mutante). Diese Art der turbidimetrischen Quantifizierung von R- $\alpha$ -Liponsäure ist aus der Literatur bekannt (Herbert und Guest, 1970, Meth. Enzymol. 18A, 269-272). Der im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendete Indikatorstamm W1485lip2 (ATCC 25645), würde allerdings auch ohne supplementierte R- $\alpha$ -Liponsäure wachsen, wenn das Medium neben Glucose auch noch Acetat und Succinat enthält. Um ein falschpositives Wachstum des Indikatorstammes im Bioassay bei der Bestimmung der produzierten R- $\alpha$ -Liponsäure zu vermeiden – beispielsweise verursacht durch einen Eintrag von Glucose und den vom Produktionsstamm zusätzlich zur R- $\alpha$ -Liponsäure ausgeschiedenen Säuren Acetat und Succinat – erfolgt bereits die Anzucht des R- $\alpha$ -Liponsäure-Produzenten bevorzugt mit Succinat als einziger Kohlenstoffquelle. Dieser Stamm wird mit dem Kulturüberstand einer erfindungsgemäßen Zellanzucht supplementiert; anhand des Wachstums des Indikatorstammes kann dann der Liponsäure-Gehalt im Kulturmedium bestimmt werden.

#### Ausführungsbeispiel

[0047] Die folgenden Beispiele dienen der weiteren Erläuterung der Erfindung. Der Bakterienstamm *Escherichia coli* W3110 $\Delta$ lplA, der für die Ausführung der Beispiele verwendet wurde, wurde bei der DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, D-38142 Braunschweig) unter der Nummer DSM 15299 gemäß Budapester Vertrag hinterlegt. Die Plasmide pKP477 und pBAD-lipB sind in der Patentanmeldung DE 10245993 beschrieben.

#### Beispiel 1: Konstruktion einer chromosomalen Mutation im lplA-Gen des Wirtsorganismus

##### A) Amplifikation des lplA-Gens

[0048] Das lplA-Gen aus *E. coli* wurde mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung der Pwo-DNA-Polymerase nach gängiger, dem Fachmann bekannter Praxis amplifiziert. Als Matrize diente die chromosomale DNA des *E. coli*-Wildtypstammes W3110 (ATCC 27325). Als Primer wurden die 3'-phosphorothioatgeschützten Oligonukleotide lplA-fwd und lplA-rev mit folgenden Sequenzen verwendet:

lplA-fwd: (SEQ ID NO: 3)

5' – CGG GAT CCC TAT CTG CGC CTG ACA CTC GAC –3'

*Bam*HI

lplA-rev: (SEQ ID NO: 4)

5' – CGG GAT CCT TTA TCT GAA CCG CCA TTT GCG CTG –3'

*Bam*HI

[0049] Das bei der PCR erhaltene DNA-Fragment mit einer Länge von ca. 1,6 kb wurde anschließend mittels eines DNA-Adsorptionssäulchens des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben gereinigt.

##### B) Konstruktion des Plasmids pK03- $\Delta$ lplA

[0050] In das PCR-Fragment wurden über die Primer-Sequenzen Schnittstellen für die Restriktionsendonuklease *Bam*HI (Erkennungssequenz in den Oligonukleotiden unterstrichen) eingeführt. Das gereinigte



PCR-Fragment wurde mit der Restriktionsendonuklease BamHI unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen geschnitten, anschließend über ein Agarosegel aufgetrennt und dann mittels des GENECLAN Kits (BIO 101 Inc., La Jolla, Kalifornien, USA) nach Herstellerangaben aus dem Agarosegel isoliert.

[0051] Zur Klonierung des lplA-Gens wurde der Vektor pUC18 (Amersham Biosciences GmbH, Freiburg, Deutschland) mit dem Restriktionsenzym BamHI unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen geschnitten, anschließend durch Behandlung mit Alkalischer Phosphatase an den 5'-Enden dephosphoryliert und dann wie das PCR-Fragment mittels der GENECLAN-Methode gereinigt.

[0052] Die Ligation des PCR-Fragments mit dem geschnittenen und dephosphorylierten Vektor erfolgte nach Herstellerangaben unter Verwendung der T4-DNA-Ligase. Die Transformation von E. coli-Zellen des Stammes DH5a mit dem Ligationsansatz wurde mittels Elektroporation in einer dem Fachmann bekannten Art und Weise durchgeführt. Der Transformationsansatz wurde auf LB-Ampicillin-Agarplatten (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, 15 g/l Agar, 100 mg/l Ampicillin) ausgebracht und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

[0053] Die gewünschten Transformanten wurden nach einer Plasmidisolierung mittels eines QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) durch eine Restriktionsanalyse identifiziert.

[0054] Das auf diese Weise erhaltene Plasmid trägt die Bezeichnung pUC18-lplA.

[0055] Um nun eine interne Deletion in das lplA-Gen einzuführen, wurde der Vektor pUC18-lplA mit den Restriktionsenzymen NruI und StuI, die jeweils einmal innerhalb des lplA-Gens schneiden, verdaut und der Vektor wie oben beschrieben mittels T4-DNA-Ligase religiert, anschließend transformiert und überprüft. Dadurch wurde ein zentraler Bereich des lplA-Gens um 197 Basenpaare deletiert und gleichzeitig eine Leserasterverschiebung eingeführt, wodurch das Gen inaktiviert wurde. Das resultierende Plasmid pUC18-ΔlplA, das nun den verkürzten Leserahmen "ΔlplA" enthält, wurde mit dem Enzym BamHI geschnitten und das 1,4 kb DNA-Fragment, welches das ΔlplA-Genfragment beinhaltet, wurde in den ebenfalls mit BamHI geschnittenen Vektor pK03 (Link et al., 1997, J. Bacteriol. 179: 6228-6237) kloniert. Das auf diese Weise erhaltene Plasmid trägt die Bezeichnung pK03-ΔlplA.

#### C) Austausch des chromosomalen lplA-Wildtyp-Gens gegen das deletierte lplA-Allel aus pK03-ΔlplA

[0056] Das Plasmid pK03-ΔlplA wurde wie oben beschrieben mittels Transformation in den Stamm W3110 eingebracht, wobei plasmidtragende Klone über die dadurch erworbene Chloramphenicol-Resistenz (20 mg/l Chloramphenicol) selektiert werden konnten. Der Austausch des chromosomalen lplA-Wildtyp-Gens gegen das deletierte ΔlplA-Allel aus pK03-ΔlplA erfolgte mittels homologer Rekombination entsprechend der Prozedur von Link et al. (1997, J. Bacteriol. 179: 6228-6237), wobei durch Ausplattieren der Zellen auf LB-Saccharose-Agarplatten gleichzeitig auf Auflösung der Cointegrate sowie auf Verlust des Plasmids, welches nun das lplA-Wildtyp-Gen enthielt, selektiert werden konnte. Saccharose-resistente Einzelkolonien wurden mittels PCR unter Verwendung der Oligonukleotide lplA-fwd (SEQ ID NO: 3) und lplA-rev (SEQ ID NO: 4) überprüft, ob der chromosomale Austausch des lplA-Wildtyp-Gens gegen die deletierte Variante ΔlplA erfolgreich war. Der auf diese Weise erzeugte Stamm trägt die Bezeichnung W3110ΔlplA.

#### Beispiel 2: Herstellung von R-α-Liponsäure-Produzenten

[0057] Das lipB-Überexpressionsplasmid pBAD-lipB wurde mittels Elektroporation in die E. coli-Stämme W3110ΔlplA und W3110 transformiert und nach Selektion auf LB-Agarplatten mit 100 mg/l Ampicillin wurde das Plasmid aus jeweils einer der Transformanten reisoliert, mit Restriktionsendonukleasen gespalten und überprüft. Mit dem Kontrollplasmid pKP477, das neben dem Ampicillin-Resistenzgen nur die Regulationssequenzen des Arabinose-Operons von E. coli (araC-Gen, araBAD-Promotorregion) enthält, wurde in analoger Weise verfahren.

#### Beispiel 3: Fermentative Produktion von R-α-Liponsäure

[0058] Für die fermentative Produktion von R-α-Liponsäure wurden die in Beispiel 2 genannten Stämme sowohl mit als auch ohne Plasmid verwendet. Als Vorkultur für die Produktionsanzucht wurden zunächst 5 ml LB-Flüssigmedium, das 100 mg/l Ampicillin enthielt, mit dem jeweiligen Stamm beimpft und für 16 h bei 37 °C und 160 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und zweimal mit dem entsprechenden Volumen steriler Saline (0,9 % NaCl) gewaschen. Mit den auf diese Weise vorbereiteten Zellen wurden schließlich 15 ml BS-Medium (7 g/l KHP<sub>2</sub>O<sub>4</sub>; 3 g/l KHP<sub>2</sub>O<sub>4</sub>; 1 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,1 g/l MgSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O; 0,5 g/l Na<sub>3</sub>Citrat × 3 H<sub>2</sub>O; 0,2% säurehydrolysiertes Casein (vitaminfrei); 13,5 g/l Na<sub>2</sub>Succinat × 6 H<sub>2</sub>O; pH 6,8 mit HCl eingestellt), das außerdem 100 mg/l Ampicillin enthielt, im Verhältnis 1:100 angeimpft. Die Inkubation der Produktionskulturen erfolgte bei 37 °C und 160 rpm auf einem Schüttler. Die Expression des Lipoyl-Protein-Ligase B-Gens auf dem Plasmid pBAD-lipB wurde durch Zugabe von 0,2 g/l L-Arabinose nach ca. 4 h Inkubation induziert. Nach 24 h Inkubation wurden Proben entnommen und die Zellen durch Zentrifu-

gation vom Kulturmedium abgetrennt. Die darin enthaltene R- $\alpha$ -Liponsäure wurde mittels des bekannten turbidimetrischen Bioassays (Herbert und Guest, 1970, Meth. Enzymol. 18A: 269-272) quantifiziert. Tabelle 1 zeigt die erzielten Gehalte freier R- $\alpha$ -Liponsäure im jeweiligen Kulturüberstand nach 24 h Inkubation:

Tabelle 1:

<b>Stamm</b>	<b>R-<math>\alpha</math>-Liponsäure [<math>\mu</math>g/l]</b>
W3110	0
W3110 $\Delta$ lplA	25
W3110 pKP477	0
W3110 $\Delta$ lplA pKP477	27
W3110 pBAD-lipB	25
W3110 $\Delta$ lplA pBAD-lipB	191

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; Consortium fuer elektrochemische Industrie GmbH

<120> Zellen und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung  
von R-alpha-Liponsaeure

&lt;130&gt; Co 10227

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 4

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1017

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Escherichia coli

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1014)

&lt;300&gt;

&lt;301&gt; Morris, Timothy W.

Reed, Kelynn E.

Cronan Jr., John E.

<302> Identification of the Gene Encoding Lipoate-Protein  
Ligase A of Escherichia coli

&lt;303&gt; J. Biol. Chem.

&lt;304&gt; 269

&lt;305&gt; 23

&lt;306&gt; 16091-16100

&lt;307&gt; 1994

&lt;400&gt; 1

atg	tcc	aca	tta	cgc	ctg	ctc	atc	tct	gac	tct	tac	gac	ccg	tgg	ttt	48
Met	Ser	Thr	Leu	Arg	Leu	Leu	Ile	Ser	Asp	Ser	Tyr	Asp	Pro	Trp	Phe	
1				5					10					15		

aac	ctg	gcg	gtg	gaa	gag	tgt	att	ttt	cgc	caa	atg	ccc	gcc	acg	cag	96
Asn	Leu	Ala	Val	Glu	Glu	Cys	Ile	Phe	Arg	Gln	Met	Pro	Ala	Thr	Gln	
			20					25					30			

cgc	gtt	ctg	ttt	ctc	tgg	cgc	aat	gcc	gac	acg	gta	gta	att	ggg	cgc	144
Arg	Val	Leu	Phe	Leu	Trp	Arg	Asn	Ala	Asp	Thr	Val	Val	Ile	Gly	Arg	
		35					40					45				

gcg	cag	aac	ccg	tgg	aaa	gag	tgt	aat	acc	cgg	cgg	atg	gaa	gaa	gat	192
Ala	Gln	Asn	Pro	Trp	Lys	Glu	Cys	Asn	Thr	Arg	Arg	Met	Glu	Glu	Asp	
	50					55					60					

# DE 102 58 127 A1 2004.07.08

aac gtc cgc ctg gcg cgg cgc agt agc ggt ggc ggc gcg gtg ttc cac	240
Asn Val Arg Leu Ala Arg Arg Ser Ser Gly Gly Gly Ala Val Phe His	
65 70 75 80	
gat ctc ggc aat acc tgc ttt acc ttt atg gct ggc aag ccg gag tac	288
Asp Leu Gly Asn Thr Cys Phe Thr Phe Met Ala Gly Lys Pro Glu Tyr	
85 90 95	
gat aaa act atc tcc acg tcg att gtg ctc aat gcg ctg aac gcg ctc	336
Asp Lys Thr Ile Ser Thr Ser Ile Val Leu Asn Ala Leu Asn Ala Leu	
100 105 110	
ggc gtc agc gcc gaa gcg tcc gga cgt aac gat ctg gtg gtg aaa acc	384
Gly Val Ser Ala Glu Ala Ser Gly Arg Asn Asp Leu Val Val Lys Thr	
115 120 125	
gtc gaa ggc gac cgc aaa gtc tca ggc tcg gcc tat cgc gaa acc aaa	432
Val Glu Gly Asp Arg Lys Val Ser Gly Ser Ala Tyr Arg Glu Thr Lys	
130 135 140	
gat cgc ggc ttc cac cac ggc acc ttg cta ctc aat gcc gac ctc agc	480
Asp Arg Gly Phe His His Gly Thr Leu Leu Leu Asn Ala Asp Leu Ser	
145 150 155 160	
cgc ctg gca aac tat ctc aat ccg gat aaa aag aaa ctg gcg gcg aaa	528
Arg Leu Ala Asn Tyr Leu Asn Pro Asp Lys Lys Lys Leu Ala Ala Lys	
165 170 175	
ggc att acg tcg gta cgt tcc cgc gtg acc aac ctc acc gag ctg ttg	576
Gly Ile Thr Ser Val Arg Ser Arg Val Thr Asn Leu Thr Glu Leu Leu	
180 185 190	
ccg ggg atc acc cat gag cag gtt tgc gag gcc ata acc gag gcc ttt	624
Pro Gly Ile Thr His Glu Gln Val Cys Glu Ala Ile Thr Glu Ala Phe	
195 200 205	
ttc gcc cat tat ggc gag cgc gtg gaa gcg gaa atc atc tcc ccg aac	672
Phe Ala His Tyr Gly Glu Arg Val Glu Ala Glu Ile Ile Ser Pro Asn	
210 215 220	
aaa acg cca gac ttg cca aac ttc gcc gaa acc ttt gcc cgc cag agt	720
Lys Thr Pro Asp Leu Pro Asn Phe Ala Glu Thr Phe Ala Arg Gln Ser	
225 230 235 240	
agc tgg gaa tgg aac ttc ggt cag gct ccg gca ttc tcg cat ctg ctg	768
Ser Trp Glu Trp Asn Phe Gly Gln Ala Pro Ala Phe Ser His Leu Leu	
245 250 255	
gat gaa cgc ttt acc tgg ggc ggc gtg gaa ctg cat ttc gac gtt gaa	816
Asp Glu Arg Phe Thr Trp Gly Gly Val Glu Leu His Phe Asp Val Glu	
260 265 270	
aaa ggc cat atc acc cgc gcc cag gtg ttt acc gac agc ctc aac ccc	864
Lys Gly His Ile Thr Arg Ala Gln Val Phe Thr Asp Ser Leu Asn Pro	
275 280 285	

# DE 102 58 127 A1 2004.07.08

gcg ccg ctg gaa gcc ctc gcc gga cga ctg caa ggc tgc ctg tac cgc 912  
Ala Pro Leu Glu Ala Leu Ala Gly Arg Leu Gln Gly Cys Leu Tyr Arg  
290 295 300

gca gat atg ctg caa cag gag tgc gaa gcg ctg ttg gtt gac ttc ccg 960  
Ala Asp Met Leu Gln Gln Glu Cys Glu Ala Leu Leu Val Asp Phe Pro  
305 310 315 320

gaa cag gaa aaa gag cta cgg gag tta tcg gca tgg atg gcg ggg gct  
1008  
Glu Gln Glu Lys Glu Leu Arg Glu Leu Ser Ala Trp Met Ala Gly Ala  
325 330 335

gta agg tag  
1017  
Val Arg

<210> 2  
<211> 338  
<212> PRT  
<213> Escherichia coli

<400> 2  
Met Ser Thr Leu Arg Leu Leu Ile Ser Asp Ser Tyr Asp Pro Trp Phe  
1 5 10 15

Asn Leu Ala Val Glu Glu Cys Ile Phe Arg Gln Met Pro Ala Thr Gln  
20 25 30

Arg Val Leu Phe Leu Trp Arg Asn Ala Asp Thr Val Val Ile Gly Arg  
35 40 45

Ala Gln Asn Pro Trp Lys Glu Cys Asn Thr Arg Arg Met Glu Glu Asp  
50 55 60

Asn Val Arg Leu Ala Arg Arg Ser Ser Gly Gly Gly Ala Val Phe His  
65 70 75 80

Asp Leu Gly Asn Thr Cys Phe Thr Phe Met Ala Gly Lys Pro Glu Tyr  
85 90 95

Asp Lys Thr Ile Ser Thr Ser Ile Val Leu Asn Ala Leu Asn Ala Leu  
100 105 110

Gly Val Ser Ala Glu Ala Ser Gly Arg Asn Asp Leu Val Val Lys Thr  
115 120 125

Val Glu Gly Asp Arg Lys Val Ser Gly Ser Ala Tyr Arg Glu Thr Lys  
130 135 140

Asp Arg Gly Phe His His Gly Thr Leu Leu Leu Asn Ala Asp Leu Ser  
145 150 155 160

# DE 102 58 127 A1 2004.07.08

Arg Leu Ala Asn Tyr Leu Asn Pro Asp Lys Lys Lys Leu Ala Ala Lys  
165 170 175

Gly Ile Thr Ser Val Arg Ser Arg Val Thr Asn Leu Thr Glu Leu Leu  
180 185 190

Pro Gly Ile Thr His Glu Gln Val Cys Glu Ala Ile Thr Glu Ala Phe  
195 200 205

Phe Ala His Tyr Gly Glu Arg Val Glu Ala Glu Ile Ile Ser Pro Asn  
210 215 220

Lys Thr Pro Asp Leu Pro Asn Phe Ala Glu Thr Phe Ala Arg Gln Ser  
225 230 235 240

Ser Trp Glu Trp Asn Phe Gly Gln Ala Pro Ala Phe Ser His Leu Leu  
245 250 255

Asp Glu Arg Phe Thr Trp Gly Gly Val Glu Leu His Phe Asp Val Glu  
260 265 270

Lys Gly His Ile Thr Arg Ala Gln Val Phe Thr Asp Ser Leu Asn Pro  
275 280 285

Ala Pro Leu Glu Ala Leu Ala Gly Arg Leu Gln Gly Cys Leu Tyr Arg  
290 295 300

Ala Asp Met Leu Gln Gln Glu Cys Glu Ala Leu Leu Val Asp Phe Pro  
305 310 315 320

Glu Gln Glu Lys Glu Leu Arg Glu Leu Ser Ala Trp Met Ala Gly Ala  
325 330 335

Val Arg

<210> 3  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Oligonukleotid  
lplA-fwd

<400> 3  
cgggatccct atctg'gcct gacactcgac

<210> 4  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Oligonukleotid  
lplA-rev

<400> 4

cgggatcctt tatctgaacc gccatttgcg ctg

33

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung enantiomerenreiner R- $\alpha$ -Liponsäure, welches **dadurch gekennzeichnet** ist, dass eine Zelle, die eine abgeschwächte Lipoyl-Protein-Ligase A-Aktivität aufweist, in einem Kulturmedium kultiviert wird, wobei die Zelle enantiomerenreine R- $\alpha$ -Liponsäure in freier Form in das Kulturmedium ausscheidet und die enantiomerenreine R- $\alpha$ -Liponsäure von dem Kulturmedium abgetrennt wird.

2. Zelle, die enantiomerenreine R- $\alpha$ -Liponsäure in ein Kulturmedium sekretiert und eine abgeschwächte Lipoyl-Protein-Ligase A-Aktivität aufweist, dadurch gekennzeichnet, dass sie anstelle eines Wildtyp lplA-Gens ein lplA-Allel besitzt, das eine Basensubstitution im Bereich der Basenpaare 367–465 aufweist, welche dazu führt, dass das LplA-Protein eine um mindestens 50% verminderte Aktivität hat oder eine Deletion im lplA-Gen aufweist.

3. Zelle nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass keine Aktivität des LplA-Proteins mehr nachweisbar ist.

4. Zelle nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine erhöhte Liponsäure-Synthase-Aktivität oder über eine erhöhte Lipoyl-Protein-Ligase B-Aktivität verfügt.

5. Zelle nach Anspruch 2, 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, dass sie ein Mikroorganismus, wie zum Beispiel eine Hefe- oder Bakterienstamm ist.

6. Zelle nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Bakterienstamm aus der Familie der Enterobacteriaceae, bevorzugt die Art Escherichia coli ist.

7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Zelle, die eine abgeschwächte Lipoyl-Protein-Ligase A-Aktivität aufweist, eine Zelle gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 2 bis 6 eingesetzt wird.

8. Verfahren nach Anspruch 1 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Abtrennung der enantiomerenreinen R- $\alpha$ -Liponsäure durch Zentrifugation des zellhaltigen Kulturmediums und anschließende Extraktion oder Präzipitation der R- $\alpha$ -Liponsäure aus dem zellfreien Kulturmedium erfolgt.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1, 7 oder 8 dadurch gekennzeichnet, dass im Kulturmedium eine Kohlenstoffquelle ausgewählt aus der Gruppe der verwertbaren Zucker, Zuckeralkohole oder organische Säuren eingesetzt wird.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 7 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass Fettsäuren mit einer Kettenlänge von C2-C8, bevorzugt mit einer Kettenlänge von C6-C8 (Hexan- bzw. Oktansäure) dem Kulturmedium zugesetzt werden.

11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Kohlenstoffquelle in einer Konzentration von 0,1-30 g/l verwendet wird.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 7 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass eine Inkubation der Zellen über einen Zeitraum von 16 – 150 h im Bereich der für die jeweiligen Zellen optimalen Wachstumstemperatur erfolgt.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

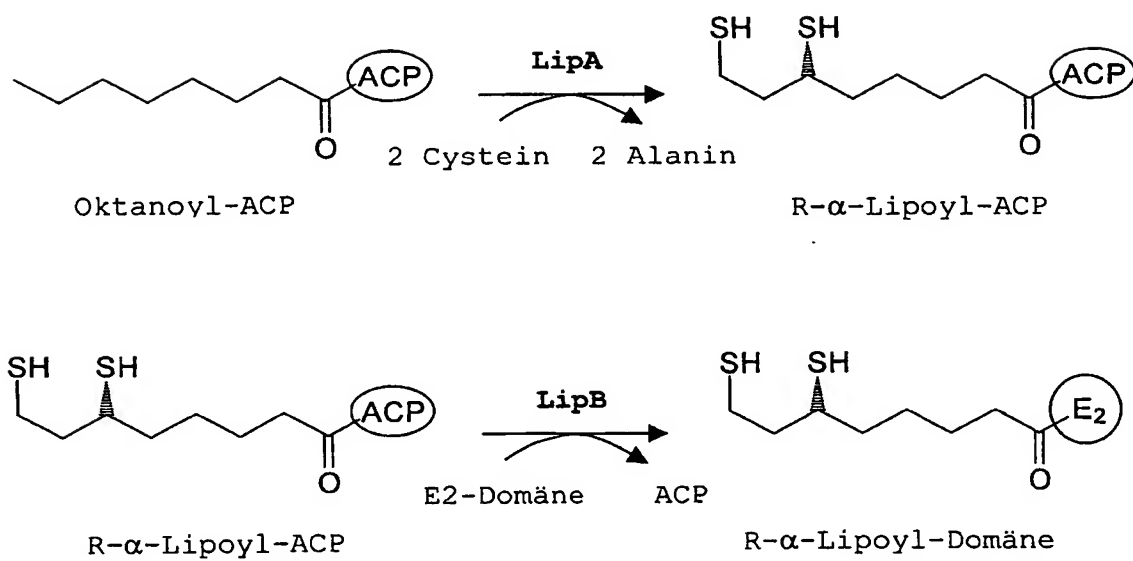
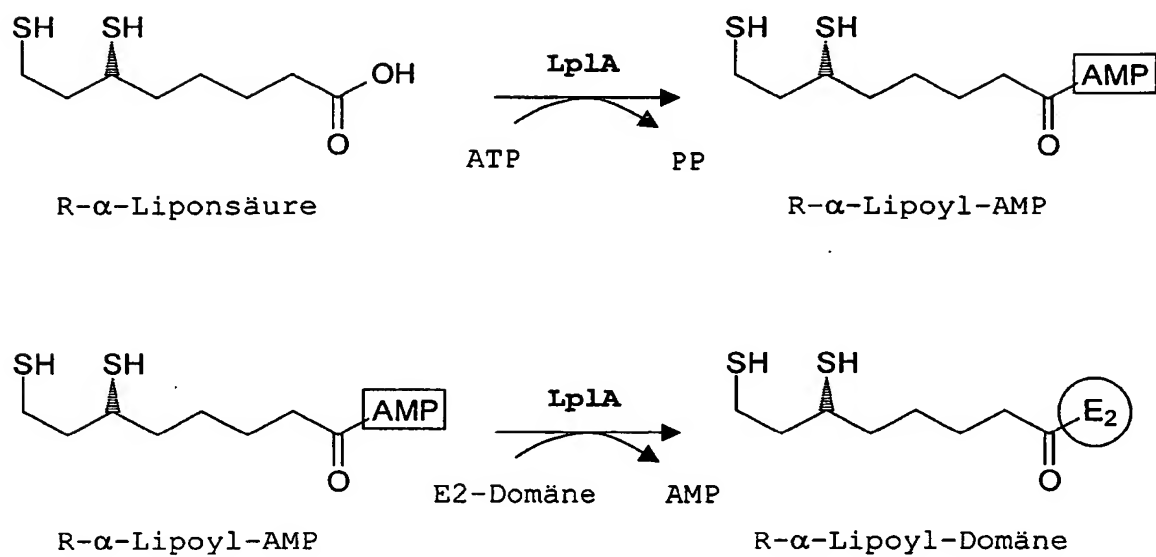
Fig. 1: Synthese der R- $\alpha$ -Liponsäure in *E. coli*



Fig. 2: Aktivierung und Einbau freier R- $\alpha$ -Liponsäure bei *E. coli* mittels der Lipoyl-Protein-Ligase A



**This Page Blank (uspto)**